



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**PESQUISA DE INFECCIÓN CON LOS VIRUS
INMUNODEFICIENCIA VIRAL FELINA Y LEUCEMIA
VIRAL FELINA EN GÜIÑAS (*Leopardus guigna*) EN LA ISLA
DE CHILOÉ**

MÓNICA PAULINA MORA CABELLO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUIA: JOSÉ PIZARRO LUCERO

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**PESQUISA DE INFECCIÓN CON LOS VIRUS
 INMUNODEFICIENCIA VIRAL FELINA Y LEUCEMIA
 VIRAL FELINA EN GÜIÑAS (*Leopardus guigna*) EN LA ISLA
 DE CHILOÉ**

MÓNICA PAULINA MORA CABELLO

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Medicina
 Preventiva Animal

NOTA FINAL:

| | NOTA | FIRMA |
|---|-------|-------|
| PROFESOR GUÍA : JOSÉ PIZARRO LUCERO | | |
| PROFESOR CONSEJERO : CARLOS NAVARRO VENEGAS | | |
| PROFESOR CONSEJERO : PEDRO SMITH SCHUSTER | | |

SANTIAGO, CHILE
 2011

MEMORIA DE TÍTULO

“PESQUISA DE INFECCIÓN CON LOS VIRUS INMUNODEFICIENCIA VIRAL FELINA Y LEUCEMIA VIRAL FELINA EN GÜIÑAS (*Leopardus guigna*) EN LA ISLA DE CHILOÉ”.

Mónica Mora Cabello

Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Los virus de la Inmunodeficiencia Viral Felina (FIV) y la Leucemia Viral Felina (FeLV), son dos de los virus más comunes que afectan a felinos domésticos (*Felis catus*). Sin embargo, durante las dos últimas décadas diversos reportes demuestran que ambas infecciones también afectan a otras especies de la Familia *Felidae*. El objetivo de este estudio consistió en la detección de FIV y FeLV en güiñas (*Leopardus guigna*), uno de los cinco felinos silvestres que habita el territorio nacional, considerado uno de los félidos más pequeños y con más restringida distribución del mundo y actualmente en estado de conservación *Vulnerable*. Muestras de 16 individuos de *L. guigna* fueron analizadas por medio de una prueba de ELISA comercial y/o por la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (PCRa). Todas las muestras resultaron negativas por ELISA; sin embargo, por PCRa, 2 individuos resultaron positivos a FIV y 3 de ellos positivos a FeLV. Los altos porcentajes de identidad nucleotídica a secuencias nucleotídicas de FIV y FeLV aislados desde gatos domésticos, almacenadas en bancos de datos internacionales, permiten confirmar el diagnóstico de infección de la especie por ambos virus y sugieren una posible transmisión interespecie de los virus. La información entregada por este estudio, es una de las primeras obtenidas en esta especie en el ámbito de las enfermedades infecciosas, otorgando información a considerar en las iniciativas que deben realizarse para la conservación y preservación de este pequeño felino.

Palabras clave: ELISA, *Felis catus*, Inmunodeficiencia Viral Felina, *Leopardus guigna*, Leucemia Viral Felina, PCR anidado, transmisión interespecie.

Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) are two of the most common viruses affecting domestic cats (*Felis catus*). However, during the last two decades, several reports show that both infections also affect other species of the family *Felidae*. The aim of this study was the detection of FIV and FeLV in güiñas (*Leopardus guigna*), one of the five wild cats inhabiting in Chile. Güiñas are considered one of smaller cats and more restricted distribution cats of the world and now are considered in a *Vulnerable* conservation state. Samples from 16 individuals of *L. guigna* were analyzed using a commercial ELISA and/ or Nested Polymerase Chain Reaction. While all samples were negative through ELISA, 2 individuals were positive for FIV and 3 of them positive for FeLV through nested PCR. The high percentages of nucleotide identity to nucleotide sequences isolated from FIV and FeLV cats, stored in international data bases, allow us to confirm the diagnosis of infection by both virus and suggest a possible interspecies transmission of viruses. The information provided by this study is one of the first obtained in this species in the field of infectious diseases, providing very relevant information to consider in efforts to the conservation and preservation of this small cat.

Key words: ELISA, Feline Immunodeficiency Virus, Feline Leukemia Virus, *Felis catus*, interspecies transmission, *Leopardus guigna*, nested PCR.

INTRODUCCIÓN

La güiña o “kodkod” (*Leopardus guigna*) es uno de los felinos más pequeños y de más restringida distribución del mundo, se encuentra en el centro sur de Chile y Argentina (Nowell y Jackson, 1996). En Chile se distribuye desde la provincia de Coquimbo (Región de Coquimbo) hasta la provincia de Bío Bío (Región del Bío Bío) y desde Malleco y Cautín (Región de la Araucanía) hasta Chiloé (Región de Los Lagos) y Aisén (Islas Guaitecas, Región de Aisén), desde el nivel del mar hasta los 1900-2500 metros de altitud (Nowell y Jackson, 1996).

En Chile, esta especie es considerada *En Peligro* según el Libro Rojo de los Vertebrados Terrestres de Chile (Glade, 1993). Esto principalmente debido a la caza y a la considerable destrucción de su hábitat, consecuencia de la creciente y extensa deforestación y fragmentación del bosque nativo del centro sur de Chile (Miller *et al.*, 1983). Por ello, desde el año 1972, esta especie se encuentra protegida en nuestro país (Iriarte *et al.*, 1997). En la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), se encuentra en el Apéndice II (CITES 2011), mientras que la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN) incluye a esta especie en su Lista Roja de Especies Amenazadas dentro de la categoría de especie *Vulnerable* (IUCN 2011).

Los virus de la Inmunodeficiencia Viral Felina (FIV) y la Leucemia Viral Felina (FeLV) pertenecen a la Familia *Retroviridae* (Murphy

et al., 1999a). Estas son dos de las más importantes infecciones virales en gatos domésticos (*Felis catus*), que afectan el sistema inmune y son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en esta especie, en la cual se ha descrito su distribución mundial (Chandler *et al.*, 2004).

La Inmunodeficiencia Viral Felina es producida por un lentivirus asociado con inmunosupresión y enfermedades oportunistas en gatos domésticos, mientras que el virus de la Leucemia Viral Felina pertenece al género *gammaretrovirus* el cual causa enfermedades neoplásicas y muy frecuentemente también lleva a inmunosupresión en gatos domésticos (Chandler *et al.*, 2004).

Ambos virus han sido descritos en otras especies de la Familia *Felidae*; en el caso de la Inmunodeficiencia Viral Felina, al menos 19 miembros de las 37 especies de esta Familia, entre los que se encuentran leones (*Panthera leo*) y leopardos (*Panthera pardus*) en África, “pallas'cat” (*Otocolobus manul*) en Asia Central y pumas (*Puma concolor*) en Norte y Sudamérica, poseen un virus relacionado con FIV, lo cual se ha evidenciado por la presencia de anticuerpos séricos que reaccionan con antígenos de FIV (Brown *et al.*, 2010). Sin embargo, no ha sido demostrado que este virus relacionado cause enfermedad en alguna otra especie distinta del gato doméstico, de hecho, lentivirus de felinos silvestres históricamente, no han sido asociados con una patogenicidad significativa. No obstante, varios leones

africanos han manifestado signos clínicos o anomalías hematológicas asociadas con infección por lentivirus (Roelke *et al.*, 2009).

Mediante análisis genéticos obtenidos desde aislados de FIV, se han descrito cepas especie-específica para: *F. catus*, *P. concolor*, *P. leo*, *P. pardus* y *O. manul*, indicando que diferentes especies felinas son infectadas por diferentes cepas de FIV (Troyer *et al.*, 2005). Sin embargo, también existen casos de transmisiones inter-especies. Entre éstos, existe un caso de un felino, subespecie del gato leopardo (*Felis bengalensis*), conocido como "Tsushima cat" (*Felis bengalensis euphilura*) el cual adquirió el FIV desde un gato doméstico (FIVfca) (Nishimura *et al.*, 1999). Casos de transmisión de FIV entre especies han sido descritas en condiciones de cautiverio, éstas incluyen un caso de FIVfca en un *P. concolor* en cautiverio en Perú, así como un caso de FIV de *P. leo*, en un leopardo de nieve (*Uncia uncia*) y en un tigre (*Panthera tigris*) en un zoológico de Asia (Carpenter *et al.*, 1996, Troyer *et al.*, 2005). Así, estos ejemplos sostienen que animales en cautiverio pueden estar en contacto directo o indirecto (vía dental o instrumental quirúrgico) con múltiples individuos de otras especies con los cuales nunca podrían encontrarse de otro modo, incrementando la probabilidad de exposición a virus no nativos (Troyer *et al.*, 2008).

Por otra parte, en condiciones naturales existe un comportamiento y una barrera ecológica que impide la transmisión entre especies de FIV, considerando que el

patógeno requiere contacto directo para que la infección ocurra, debido a que el mayor modo de transmisión de FIV en gatos domésticos se cree que es por mordeduras. No obstante, la transmisión vertical puede también ocurrir (Troyer *et al.*, 2008). Asumiendo que los FIVs de los felinos no domésticos tienen un similar modo de transmisión e infección visto en otros lentivirus, el contacto íntimo entre individuos de diferentes especies es poco común, especialmente en especies solitarias que generalmente evitan el contacto con otros individuos (Franklin *et al.*, 2007a). Sin embargo, en situaciones en que las especies relacionadas tienen encuentros agresivos frecuentes, y uno puede ser presa de otro, la infección entre especies podría ocurrir (Troyer *et al.*, 2008). Recientemente, fue descubierta una cepa de FIV casi idéntica en pumas y "bobcat" o gato montés (*Lynx rufus*) los cuales ocupaban el mismo hábitat en Florida y California, sugiriendo fuertemente una transmisión entre especies y la emergencia de una cepa de FIV con amplio tropismo de huésped (Franklin *et al.*, 2007a).

Con respecto a la Leucemia Viral Felina ésta es poco común en felinos no domésticos. Infecciones reportadas en felinos no domésticos en cautiverio incluyen un *F. bengalensis*, un *P. concolor*, un "clouded leopardo" o pantera longibanda (*Neofelis nebulosa*), un *F. bengalensis*, un macho de ocelote (*L. pardalis*), una hembra de tigrillo (*L. tigrinus*) y varios guepardos o "cheetahs" (*Acinonyx jubatus*) (Sleeman *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2008; Guimaraes *et al.*, 2009). A pesar de las numerosas pruebas

serológicas realizadas en poblaciones de felinos silvestres en libertad, reportes publicados de infección por FeLV en estado silvestre se limitan a, tres *P. concolor* y un “sand cat” o gato del desierto (*Felis margarita*). En gatos montés europeos (*Felis silvestris silvestres*), un 10-24% también fueron positivos para antígenos de FeLV, aún cuando el cruzamiento entre esta especie y los gatos domésticos ocurre frecuentemente (Cunningham *et al.*, 2008). En un estudio de zoológicos de Norte América, siete de once (64%) felinos no domésticos que inicialmente fueron positivos a antígeno del FeLV, posteriormente fueron negativos cuando se remuestrearon. Los otros cuatro felinos que no fueron remuestreados, no desarrollaron signos clínicos de FeLV (Cunningham *et al.*, 2008). Infecciones persistentes fueron observadas en un *P. concolor* libre, en un *P. concolor* en cautiverio, un *Lynx rufus* y *Acinonyx jubatus*, con resultados de patología y necropsia que incluían anemia, linfopenia, otras citopenias, linfadenopatía, septicemia, infecciones oportunistas y linfoma (Brown *et al.*, 2008).

El riesgo de introducción de nuevas enfermedades infecciosas en poblaciones de felinos silvestres, se ha incrementado por la usurpación del hombre y sus animales domésticos del hábitat de la mayoría de los felinos no domésticos (Troyer *et al.*, 2005). La creciente pérdida de hábitat de muchas especies de felinos puede ayudar en el incremento de agresiones inter e intraespecies, facilitando la extensión y transmisión entre especies de enfermedades infecciosas. Sumado a esto, la disminuida

diversidad genética en la mayoría de las poblaciones silvestres reduce la habilidad de estas especies a adaptarse a nuevas enfermedades virales (Troyer *et al.*, 2005). Así, la emergencia de enfermedades infecciosas dentro de nuevas especies hospederas o poblaciones nativas, puede influir en gran medida en la supervivencia y adaptación de la especie (Pecon-Slattey *et al.*, 2008).

El objetivo de esta memoria de título es la detección de infección con los virus Inmunodeficiencia Viral Felina (FIV) y Leucemia Viral Felina (FeLV) en güiñas (*Leopardus guigna*) de la Isla de Chiloé.

MATERIAL Y MÉTODOS

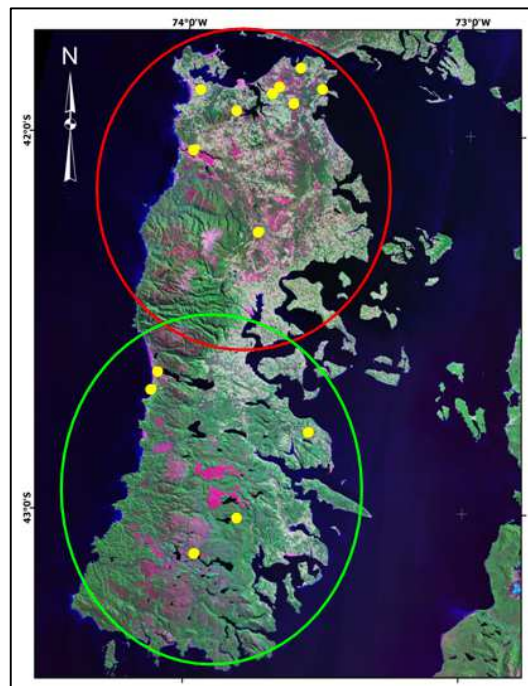
▪ Sitio de estudio

El estudio se realizó en la Isla Grande de Chiloé, perteneciente a la Provincia de Chiloé, X Región de Los Lagos, Chile. Se trabajó en la zona norte y sur de la Isla de Chiloé; la zona norte de la Isla de Chiloé presenta su costa noroeste compuesta de un bosque nativo continuo no alterado, mientras que su costa norte y noreste esta compuesta por un paisaje de bosque nativo fragmentado, por su parte la zona sur de la Isla de Chiloé esta compuesta por un paisaje de bosque nativo no perturbado. En la zona norte de la isla, se trabajó en las localidades de Caulin-Senda Chacao, Quilar, Ahuenco y Chepu, mientras que en la zona sur el estudio se realizó en las zonas de Cucao, perteneciente al Parque Nacional Chiloé, Rahue, Quilán y finalmente en el Parque privado "Tantauco" (Figura 1).

▪ Muestreo

Se recolectaron muestras sanguíneas de los individuos capturados de *L. guigna* en los sitios de estudio anteriormente mencionados. La captura de los individuos se realizó en trampas tipo *Tomahawk* N° 207. Las trampas fueron cebadas con pollos trozados y/o comida para gatos domésticos, pescado y sardinas o atún enlatados. Las trampas fueron puestas principalmente en bosques y quebradas boscosas. Se utilizaron esencias atractoras de gato montés como atractor olfativo para aumentar las posibilidades de captura.

Figura 1. Zonas de muestreo en la Isla de Chiloé



Círculos amarillos, muestran las localidades muestreadas en la isla de Chiloé; **Círculo rojo** muestra la zona norte de la isla (altamente perturbada); **Círculo verde**, muestra la zona sur de la isla (no perturbada).

Los animales capturados, fueron anestesiados con ketamina, en dosis de 15 mg/kg vía intramuscular. Posteriormente, fueron pesados, sexados y medidos (circunferencia de la cabeza y del cuello; largo de la cola, cuerpo, pata trasera, oreja y canino). Se clasificó a cada animal capturado, en individuos adultos o juveniles, según dentición y desarrollo de testículos en el caso de los machos y glándulas mamarias en el caso de las hembras.

Las muestras de sangre fueron obtenidas depilando y desinfectado la zona y posterior venipuntura de la vena cefálica o yugular. Las muestras sanguíneas fueron colectadas en tubos de vacío (VACUTAINER®) de 1-2 ml con anticoagulante (EDTA, ácido etilen diamino

tetra acético) para la posterior obtención de plasma y capa flogística y, en un tubo sin anticoagulante para la obtención de suero.

Todos los animales capturados fueron marcados con pequeños (8,5 mm x 2,12 mm) dispositivos pasivos o “microchips” implantados subcutáneamente.

Junto al muestreo sanguíneo, se realizó la necropsia de individuos de *L. guigna*, muertos recientemente por situaciones ajenas a nuestro estudio, de los cuales no fue posible obtener muestras sanguíneas. En el procedimiento de necropsia, se extrajo muestras de médula ósea y placas de Peyer.

El período de muestreo se extendió desde abril 2008 hasta abril 2010, para lograr muestrear la mayor cantidad de individuos que habitaban cada uno de los sitios de estudio.

En paralelo al muestreo de güiñas, se realizó un muestreo sanguíneo de gatos domésticos que habitaban sectores aledaños a los sitios de muestreo de güiñas.

▪ **Análisis de las muestras**

Güiñas (*Leopardus guigna*)

Las muestras sanguíneas obtenidas fueron procesadas para la obtención de suero, plasma y leucocitos y, conservadas a -20°C para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Virología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Diagnóstico serológico:

Las muestras de suero y/o plasma fueron utilizadas para el diagnóstico de FIV y FeLV en las güiñas, utilizando una prueba de ELISA comercial (Snap® Combo Plus, IDEXX, USA). La prueba es un inmunoensayo rápido para la detección simultánea de anticuerpos de Inmunodeficiencia Viral Felina (FIV) y de antígenos de Leucemia Viral Felina (FeLV) en suero, plasma o sangre entera. La presencia de antígeno de FeLV es de diagnóstico para la infección de FeLV, mientras que la presencia de anticuerpos específicos a FIV indica que el felino se ha expuesto al virus y puede tener una infección activa. La técnica fue realizada bajo las recomendaciones sugeridas por el fabricante.

Diagnóstico molecular:

La técnica diagnóstica utilizada fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (PCRa). Para esto, se realizó extracción de DNA desde la capa flogística obtenida de las muestras sanguíneas con EDTA y desde las muestras de tejidos obtenidas de los individuos muertos. En el caso de las muestras sanguíneas, la capa flogística se obtuvo por centrifugación a 1000 xg por 5 minutos. Luego de retirar la capa flogística, se realizó lisis de eritrocitos agregando Cloruro de amonio 0,83%, en una relación de volumen 1:2. Luego de agitar en vórtex se incubó a temperatura ambiente durante 20 a 25 minutos y se centrifugó a 2400 xg por 5 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante el sedimento se resuspendió

en 1000 µL de buffer PBS (1X) pH 7,6 y se procedió a centrifugar a 2400 xg durante 5 minutos. A continuación, fue realizada la extracción de DNA desde el sobrenadante, utilizando para esto el reactivo Prepman® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems). Para las muestras de tejido se utilizó un kit comercial específico (QIAGEN DNeasy® Tissue Kit), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La cantidad de DNA extraído, fue estimado a través de la medición de la concentración de DNA utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000.

Detección de ADN proviral del virus Inmunodeficiencia Viral Felina (FIV) por PCRa

El PCR anidado fue utilizado para amplificar un fragmento de 291 pb de la región genómica gag de FIV. Los partidores externos (SF-1s y SF-2a) amplifican un fragmento de 678 pb en la región 1024 a 1702 de la cepa Petaluma, mientras que los partidores internos (FIV-2N y FIV-4M) amplifican el fragmento de 291 pb en la región 1104 a 1395 de la cepa Petaluma (Talbot *et al.*, 1989; Cammarota *et al.*, 1996) (Tabla 1).

Para la primera reacción de PCR la mezcla de reacción contenía: 3 µl de ADN total y una mezcla de reacción constituida por: 0,2 mM de dNTPs, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1µg/ml BSA, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 0,6 µM de cada partidor específico (SF-1s, SF-2a), 2,2 mM de MgCl₂, 1.25 U de Taq DNA Polymerase Recombinant

Tabla 1. Partidores utilizados en el PCRa

| PARTIDORES | | | |
|-----------------|--------|---------|----------------------------|
| Infección Viral | Nombre | | Secuencia 5' → 3' |
| FIV | p.e. | SF- 1s | GGCATATCCTATTCAAACAGTAAA |
| | | SF- 2a | GCCAAGAGTTGCATTTTATATCCTGG |
| | p.i. | FIV-2N | AAGGCAAGAGAAGGACTAGGAG |
| | | FIV-4M | TACTACTGCATCCTAGCTGGTG |
| FeLV | p.e. | LF- 1s | CTACCCCAAATTTAGCCAGCTACT |
| | | LF- 2a | AAGACCCCGAACTAGGTCTTC |
| | p.i. | FLV-F18 | GTCTCCAGGCTCCCCAGT |
| | | FLV-R20 | ACCGAGACCACGAGTCAGAT |

FIV: Inmunodeficiencia viral felina; **FeLV:** Leucemia viral felina; **p.e:** partidor externo; **p.i:** partidor interno. **Primers forward:** SF-1s, FIV-2N, LF-1s, FLV-F18; **Primers reverse:** SF-2a, FIV-4M, LF-2a, FLV-R20.

(Invitrogen™), completándose un volumen final de 25 µL con agua ultra pura. La PCR se realizó en un termociclador PTC-100™ (MJ Research Inc.). El programa de termociclado consistió en, una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, y 40 veces el siguiente ciclo: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación de partidores a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. La extensión final se realizó a 72°C por 7 minutos y posteriormente se mantuvo a 4°C hasta la realización de la electroforesis. La segunda reacción de PCR contenía una mezcla de reacción con: 1 µl del producto de la primera reacción de PCR y una mezcla de reacción constituida por: 0,2 mM de dNTPs, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1µg/ml BSA, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 0,6 µM de cada partidor específico (FIV-2N, FIV-4M), 5 mM de MgCl₂, 1.25 U de Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen™), completándose un volumen final de 25 µL con agua ultra pura. El programa de termociclado utilizado, fue el mismo utilizado en la primera reacción de PCR.

Los ADN sintetizados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% (Ultra Pure™ Agarose, Invitrogen) a 120 volts por 60 minutos y, posteriormente fueron teñidos con Bromuro de etidio. Como control positivo se utilizó una muestra de gato doméstico virémico a FIV detectado por PCR y confirmado por secuenciación de la región genómica diagnosticada.

Detección de ADN proviral del virus Leucemia Viral Felina (FeLV) por PCRa

El fragmento a amplificar, correspondía a un fragmento de 211 pb de la región genómica *U3 LTR*, región muy conservada entre las variantes de FeLV, que no está presente en otros retrovirus exógenos o dentro de las cerca de 20 secuencias endógenas relacionadas con FeLV (Casey *et al.*, 1981; Tandon *et al.*, 2005; Guimaraes *et al.*, 2009).

Los partidores externos (LF-1s; LF-2a), amplifican un fragmento de 468 pb en la región 12 a 480 del genoma viral de la cepa Rickard (Tandon *et al.*, 2005). Mientras que, los partidores internos (FLV-F18; FLV-R20), amplifican el fragmento de 211 pb en la región 217 a 428 de la cepa Rickard y fueron sintetizados considerando su presencia en los tres subtipos (A, B y C) de este retrovirus (Tabla 1).

Para la primera reacción de PCR las concentraciones de los reactivos, fueron las mismas utilizadas en la primera reacción de PCR de FIV, empleando para esta los partidores externos (LF-1s; LF-2a). Para la segunda reacción de PCR, la mezcla de reacción contenía: 1 µl del producto de la primera reacción de PCR y una mezcla de reacción constituida por: 0,2 mM de dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1µg/ml BSA, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 0,6 µM de cada partidor específico (FLV-F18, FLV-R20), 2,5 mM de MgCl₂, 1.25 U de Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen™), completándose un volumen final de 25 µL con agua ultra pura. El programa de

termociclado utilizado tanto en la primera, como en la segunda reacción de PCR, fue el mismo empleado para FIV.

La amplificación fue constatada por medio de electroforesis en gel de agarosa 2%, teñidos con Bromuro de etidio, designándose como positivos o negativos bajo el transiluminador UV. El control positivo utilizado, correspondía a un gato virémico a FeLV, diagnosticado por PCR y confirmado por secuenciación de la región genómica.

Gatos domésticos (*Felis catus*)

Las muestras sanguíneas obtenidas de gatos domésticos (*Felis catus*) fueron utilizadas para el diagnóstico de FIV y FeLV, utilizando la PCRa con el mismo protocolo que la técnica fue realizada, en las muestras de güiña (*Leopardus guigna*). Se utilizó para esto, el mismo proceso de extracción de DNA descrito anteriormente.

Para descartar posibilidades de contaminación de los productos de PCR, se realizaron al menos tres amplificaciones independientes de cada extracción de DNA, derivadas de las muestras de *L. guigna* y gatos domésticos, obteniendo en todas las ocasiones los mismos resultados.

Análisis genético de los amplicones obtenidos por PCRa

Para confirmar las muestras positivas a ambos virus obtenidas por la PCRa, a los amplicones se les determinó su secuencia nucleotídica, las que posteriormente fueron comparadas con secuencias de ambos virus almacenadas en bancos de datos

internacionales. Para esto, los amplicones fueron purificados utilizando un kit de purificación comercial (HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit RBC Bioscience), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para cuantificar los amplicones se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio. Para esto, a 1µl del fragmento de PCRa purificado se agregó 1µl de Loading Dye Solution 6x (Fermentas), 4µl de agua ultra pura y se cargó en el gel. La electroforesis se efectuó a 120V por 30 minutos. El fragmento de ADN amplificado se cuantificó por comparación con un marcador de peso molecular de ADN de 72-1353 pb (Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9, Fermentas). Los amplicones se enviaron a secuenciar a la empresa Biogenetics.

A las secuencias nucleotídicas obtenidas se les realizó un análisis de identidad nucleotídica en la base de datos nucleotídicos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

▪ Expresión de resultados

Los resultados fueron expresados como frecuencia absoluta, en porcentaje, de animales positivos a FeLV y animales positivos a FIV del total de animales muestreados.

RESULTADOS

Se logró capturar 12 individuos de *L. guigna*, incluyendo la recaptura de uno de estos individuos, a las cuales de les extrajo muestras sanguíneas. Además se obtuvieron muestras de tejidos de 4 individuos de güiña muertas recientemente lo que permitió asegurar la integridad y calidad de las muestras obtenidas para el estudio (Tabla 2). Las concentraciones de DNA obtenidas fluctuaron entre 41 a 157 ng/μl para muestras sanguíneas y entre 139 a 2448 ng/μl para muestras de tejidos.

De las 16 muestras obtenidas de *L. guigna*, solo las muestras sanguíneas obtenidas de 12 individuos de güiña, pudieron ser diagnosticadas por serología. Todas las muestras analizadas, resultaron negativas tanto para FIV, como para FeLV, utilizando el kit de ELISA comercial (Snap® Combo Plus, IDEXX, USA).

En el caso del diagnóstico molecular, empleando PCRa, de las 16 muestras obtenidas, solo 15 se diagnosticaron por este método. Esto debido a que, 1 de las muestras sanguíneas poseía un volumen inferior al requerido para la realización de esta técnica. Producto del análisis empleando PCRa, 2 muestras resultaron positivas a FIV y 3 muestras resultaron positivas a FeLV, basado esto, en la presencia de un ADN del tamaño esperado. De estas muestras, 1 resultó positiva a ambos virus (Figura 2 y 3).

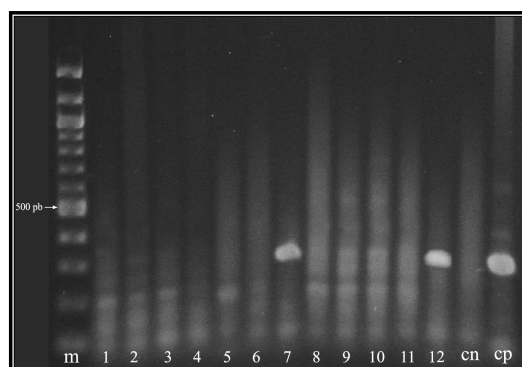


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los PCRa para ADN proviral de FIV en *L. guigna*
La imagen muestra el producto de PCR para FIV, del tamaño esperado, 291 pb. Columnas 7 y 12 son positivas a FIV. Columnas 1-6, 8-11 son negativas a FIV. **m**: marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Fermentas); **cn**: control negativo; **cp**: control positivo.

Tabla 2. Datos muestras *Leopardus guigna*

| <i>Leopardus guigna</i> | Sexo | Edad aproximada | Localidad | Tipo de muestra | Resultados PCRa |
|-------------------------|--------|-----------------|--------------|-----------------|-------------------|
| 1 | hembra | 8-10 meses | Senda Chacao | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 2 | macho | 3 años | Senda Chacao | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 3 | macho | 1-1 1/2 año | Caulín | sangre | (+) FIV; (-) FeLV |
| 4 | macho | 1 1/2 año | Senda Chacao | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 5 | hembra | 4-5 meses | Senda Chacao | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 6 | macho | 1 año | Caulín | sangre | (-) FIV; (+) FeLV |
| 7 | macho | 1 1/2 – 2 años | Caulín | sangre | (-) FIV; (+) FeLV |
| 8 | hembra | 1 año | Caulín | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 9 | macho | 1 año | Senda Chacao | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 10* | hembra | 1 1/2 año | Senda Chacao | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 11 | macho | 2 años | Coínco | tejido | (-) FIV; (-)FeLV |
| 12 | macho | 3-4 años | Senda Chacao | sangre | (-) FIV; (-)FeLV |
| 13 | macho | 1 año | San Antonio | sangre | (+) FIV; (+) FeLV |
| 14 | hembra | 1 año | Quempillén | tejido | (-) FIV; (-)FeLV |
| 15 | s/i | s/i | Huinay | tejido | (-) FIV; (-)FeLV |
| 16 | hembra | 1-1 1/2 año | Tenaun | tejido | (-) FIV; (-)FeLV |

s/i: sin información; *****: recaptura de *Leopardus guigna* 1, aproximadamente 8 meses después de la 1º captura; **(-)**: negativo a la infección; **(+)**: positivo a la infección.

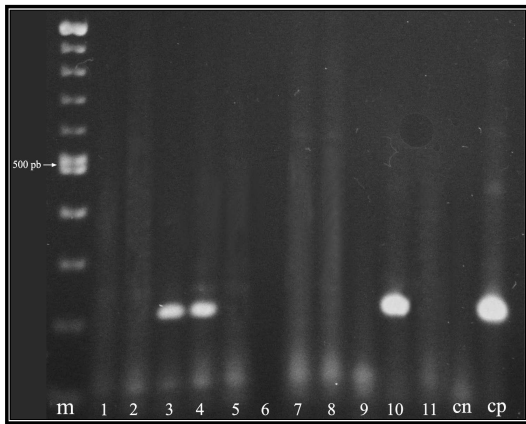


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los PCRa para ADN proviral de FeLV en *L. guigna*
 La imagen muestra el producto de PCR para FeLV, del tamaño esperado, 211 pb. Columnas 3,4 y 10 son positivas a FeLV. Columnas 1,2, 5-9 y 11 son negativas a FeLV. **m:** marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Fermentas); **cn:** control negativo; **cp:** control positivo.

Por lo tanto, un 13,3% (2/15) y un 20% (3/15) de las muestras analizadas por PCRa resultaron ser positivas para virus Inmunodeficiencia Viral Felina y virus Leucemia Viral Felina, respectivamente (Tabla 3). Todos los individuos positivos tanto para FIV, como para FeLV fueron machos, fluctuando sus edades entre 1 a 2 años.

En gatos domésticos, se obtuvieron 78 muestras sanguíneas. Las cuales al ser analizadas por medio de PCRa, entregaron los siguientes resultados: 2,6% (2/78) de las muestras resultaron positivas a FIV, mientras que un 33,3% (26/78) resultaron positivas a FeLV. De ellas, 1 muestra resultó positiva a ambos virus (Tabla 3). En cuanto a

la distribución por sexo, en el caso de FIV, de los 2 individuos positivos, uno fue hembra y el otro macho. En FeLV, de los 26 individuos positivos, 12 fueron hembras y 14 machos.

El análisis genético de los ADN obtenidos en los PCRa positivos se realizó a 1 FIV y a 2 FeLV de güiñas. En el caso del FIV de güiña, las 100 secuencias nucleotídicas más similares corresponden a FIV de gatos domésticos, con un porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) entre 94-98% (Anexo 1). Los virus más similares son cepas del subtipo B, aisladas en Brasil, Canadá e Italia. En el caso de los FeLV de güiñas, las 2 secuencias nucleotídicas son distintas entre sí, pero en ambos casos, las 100 secuencias nucleotídicas más similares corresponden a FeLV, con un porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) entre 93-99% en un aislado y entre 93-98% en el otro virus (Anexo 2). En ambos casos, los virus más similares son cepas del subtipo A, aisladas en Brasil.

Tabla 3. Resultados de infección en *L. guigna* y *F. catus*, por medio de ELISA y PCRa.

| Infección Viral | <i>Leopardus guigna</i> | | | | <i>Felis catus</i> | |
|-----------------|-------------------------|---|-----------|------|--------------------|------|
| | ELISA | | PCRa | | PCRa | |
| | pos/total | % | pos/total | % | pos/total | % |
| FIV | 0/12 | 0 | 2/15 | 13.3 | 2/78 | 2.56 |
| FeLV | 0/12 | 0 | 3/15 | 20 | 26/78 | 33.3 |

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio se suman a otras investigaciones, en las cuales felinos no domésticos ya sea en vida silvestre o en cautiverio resultaron positivos a Inmunodeficiencia Viral y Leucemia Viral Felina por medio de métodos diagnósticos serológicos y/o moleculares (Olmsted *et al.*, 1992; Hofmann- Lehmann *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 1999; Sleeman *et al.*, 2001; Biek *et al.*, 2003; Troyer *et al.*, 2005; Pecon-Slattery *et al.*, 2008; Guimaraes *et al.*, 2009; Meli *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2010; Thalwitzer *et al.*, 2010).

Los resultados entregados por este estudio indican que 13,3% y 20% de las güiñas fueron positivas a los virus Inmunodeficiencia Viral Felina y Leucemia Viral Felina, respectivamente, por PCRa. Esto evidenciado en primera instancia por la presencia de una banda del tamaño esperado según los partidores utilizados en la reacción y, en segunda y confirmatoria instancia por los resultados entregados por medio de la secuenciación y posterior análisis genético.

Los altos PIN del aislado FIV detectado en güiñas, con las secuencias nucleotídicas de virus aislados desde gatos domésticos, disponibles en bancos de datos internacionales, permite por una parte confirmar el diagnóstico de infección por FIV en esta especie y por otra parte, sugerir que la infección sería por un virus de gato doméstico (FIVfca), más que por un virus propio de la especie o de un virus que infecta a otras especies de felinos silvestres (Troyer

et al., 2005). Considerando la infección por FIV en gatos domésticos de la isla, donde un 2,6% (2/78) resultó positivo a la infección, este escenario es posible.

Si bien el virus detectado en güiña es muy similar genómicamente a los virus aislados desde gatos domésticos, esto no implica necesariamente que la infección haya ocurrido directamente desde un gato doméstico. El virus podría estar circulando dentro de la población de güiñas y la infección haber ocurrido entre individuos de la misma especie.

Por otra parte, no es descartable totalmente que el virus FIV detectado en güiñas sea propio de la especie, pese a ser genómicamente muy similar a los virus presentes en gatos domésticos. Análisis de filogenia molecular de aislados virales obtenidos desde güiñas, gatos domésticos y de otras especies de felinos, además de infecciones experimentales de gatos domésticos y güiñas con virus aislados desde ambas especies ayudarían a dilucidar esta interrogante.

Las transmisiones interespecies de FIV se han descrito como eventos extremadamente poco comunes entre especies en vida silvestre y como eventos ocasionales entre especies en cautiverio (Troyer *et al.*, 2008). Esto debido probablemente a mecanismos de restricción, ya sean ambientales o adaptativos del posible hospedero, los que limitarían la transmisión de cepas de lentivirus entre especies (Troyer *et al.*, 2008, VandeWoude *et al.*, 2010). Sin embargo, investigaciones

previas en otras especies de felinos silvestres (Carpenter *et al.*, 1996, Nishimura *et al.*, 1999, Troyer *et al.*, 2005, Franklin *et al.*, 2007a) dan cuenta de transmisiones interespecies de FIV, en las que la proximidad entre las especies ya sea por su condición en cautiverio o uso de hábitats limitados entre las especies en vida silvestre, se ve aumentada, lo cual favorecería una mayor interacción y posibilitaría la transmisión del virus.

Al igual que lo reportado por Nishimura *et al.*, (1999) y Franklin *et al.*, (2007a), este estudio fue realizado en animales en vida silvestre. De este modo, las condiciones del paisaje donde se realizó el estudio toman relevancia. En Chiloé, la güiña es la única especie, de las cinco especies de felinos silvestres que encontramos en nuestro país, que habita este territorio (Iriarte 2008). Por lo tanto, en esta isla solo existirían dos especies de la familia *Felidae* registradas a la fecha: el gato doméstico y la güiña.

Los dos individuos de *L. guigna* positivos a FIVfca, habitaban la zona norte de la Isla de Chiloé, en la cual los bosques forman un paisaje fragmentado alterado por actividades humanas. Esto lleva a situaciones en las que este felino se ve involucrado, como la caza de aves de corral, condición asociada a los asentamientos humanos en un paisaje fuertemente antropogénico, en el cual los recursos tróficos se ven disminuidos (Sanderson *et al.*, 2002). Dicha situación es una de las situaciones habituales en las cuales el contacto entre esta especie y los felinos

domésticos podría ocurrir, sumado, a los encuentros casuales que podrían favorecer el contacto y desencadenar la posterior transmisión del virus.

Cabe señalar que la situación de ataque a las aves de corral de los gallineros, lleva a que esta especie posea una mala reputación en muchas áreas agrícolas, donde actualmente es perseguida y cazada en forma indiscriminada (Sanderson *et al.*, 2002, Zorondo 2005, Simonetti 2006).

Las condiciones del sitio de estudio de nuestra investigación, se asemejan al de Nishimura *et al.*, (1999), en la cual existió una transmisión interespecie de FIVfca desde un gato doméstico a un "Tsushima cat" (*Felis bengalensis euphilura*), especie de felino silvestre japonés en peligro de extinción. Dicho estudio, al igual que esta investigación, se realizó en una isla en la cual sólo habitaban las dos especies de felinos, el gato doméstico y el "Tsushima cat".

Los resultados obtenidos para Leucemia Viral Felina por medio de PCRa, indican que un 20% de las güiñas analizadas resultaron positivas al virus. Al igual que en el caso de FIV, los altos PIN de los dos virus FeLV detectados en güiñas, con las secuencias nucleotídicas de virus aislados desde gatos domésticos, disponibles en los bancos de datos internacionales, también permite por una parte confirmar el diagnóstico de infección por FeLV en esta especie y por otra parte, sugerir que la infección sería producto de una transmisión interespecie del virus.

Si bien, los reportes de infección de felinos silvestres infectados con Leucemia Viral Felina, son menos frecuentes que los eventos reportados de Inmunodeficiencia Viral Felina en felinos silvestres, la transmisión interespecie del virus desde felinos domésticos, en todos los reportes previos de FeLV (Sleeman *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2008, Guimaraes *et al.*, 2009; Meli *et al.*, 2009), ha sido el origen más probable de la infección, a diferencia de lo descrito anteriormente para FIV.

Investigaciones previas de Cunningham *et al.*, 2008 y Meli *et al.*, 2009, mostraron que el origen de la infección en *Puma concolor* y en *Lynx pardinus*, respectivamente, fue producto de gatos domésticos infectados; en cuyos sitios de estudio se observó, que la población de gatos domésticos iba en aumento. Si bien, en el sitio de estudio de esta investigación, no existen a la fecha estimaciones del tamaño poblacional de gatos domésticos; la población de gatos domésticos y asilvestrados va en aumento (Hetz J., comunicación personal)¹. Si se considera lo anterior, las condiciones del paisaje del sitio de estudio descritas anteriormente y, los resultados obtenidos en el estudio con respecto a la infección en gatos domésticos por FeLV en la isla, donde un 33,3% (26/78) de los individuos muestreados resultaron positivos; la transmisión del virus desde felinos domésticos a individuos de güiña se hace probable, lo cual una vez que la barrera

de especie ha sido cruzada, posibilita la propagación del virus entre individuos de la misma especie (Cunningham *et al.*, 2008).

Cabe señalar que la secuencia nucleotídica entregada por el análisis genético de los controles positivos de FIV y FeLV, mostraron una secuencia nucleotídica diferente a la secuencia de los individuos que resultaron positivos a las infecciones en estudio, descartando la posibilidad de una contaminación de laboratorio.

Los métodos diagnósticos utilizados en el estudio (ELISA, PCRa), entregaron resultados discordantes. Por una parte, todas las muestras de *L. guigna* analizadas por medio del kit de ELISA comercial (Snap® Combo Plus, IDEXX, USA) resultaron negativas, mientras que por medio de PCRa, 2 y 3 muestras resultaron positivas para FIV y FeLV, respectivamente. El uso de kits de ELISA comerciales en felinos no domésticos ha sido registrado en los últimos años. La reacción ocurre porque el virus de FeLV se supone es el mismo en felinos domésticos y silvestres y, existe suficiente homología de secuencia entre los lentivirus de felinos domésticos y no domésticos (Filoni *et al.*, 2003).

Por lo tanto, la discordancia de resultados obtenida en nuestro estudio, asumiendo que el curso de la infección en felinos silvestres es similar al de gatos domésticos, en el caso de FeLV podría explicarse por: una de las cuatro formas de infección de esta enfermedad, *infección regresiva*, en el cual no existe antígeno o

¹ **Jennifer Hetz.** Médico Veterinario. Fundación Senda Darwin. Ancud, Chiloé, Región de los Lagos, Chile.

virus cultivable presente en sangre, pero en la cual el DNA proviral de FeLV puede ser detectado en sangre (Arjona *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2008; Geret *et al.*, 2011). En el caso de FIV, resultados positivos por PCR y seronegativos pueden ocurrir en situaciones en que los individuos no han seroconvertido, o en avanzados estados clínicos, en los cuales la debilidad del sistema inmune dificulta la producción de anticuerpos (Arjona *et al.*, 2007). En este estudio, el examen clínico de todos los individuos de *L. guigna* no reveló alteraciones clínicas evidentes compatibles con algún estado de infección por FIV y/o FeLV.

Por otra parte, tal como ocurre con otros virus en el proceso de adaptación a un nuevo hospedero, no es descartable que el virus haya experimentado cambios genéticos en distintas zonas del genoma, con las consiguientes alteraciones biológicas y antigénicas, que podrían explicar los resultados negativos obtenidos (Murphy *et al.*, 1999b). Además de la posibilidad no descartada de que se trate de un virus propio de la especie, con determinantes antigénicos distintos a los presentes en virus de gatos domésticos.

Es de importancia considerar que los ensayos son diseñados para animales domésticos y, en su mayoría no han sido validados para su uso en vida silvestre (Gardner *et al.*, 1996; Filoni *et al.*, 2003). Por lo tanto, los resultados obtenidos deben ser interpretados con precaución en especies donde la prueba no ha sido evaluada (Franklin *et al.*, 2007b). Nuestros resultados

sumados a la información previa, sugieren que el kit de ELISA comercial podría no ser un buen método diagnóstico para retrovirus en la especie en estudio.

A la fecha solo existe un estudio previo en que se buscó infección por virus Inmunodeficiencia Viral Felina en guías (Troyer *et al.*, 2005). Si bien en este estudio no se pudo establecer infección con este virus, el hecho de haberse realizado solo en 2 animales en cautiverio y además, que el método utilizado: "Western blot", posea una baja sensibilidad y solo sea capaz de detectar antígenos virales y no al provirus, hace que los resultados sean poco comparables con los reportados en esta memoria de título.

Los resultados obtenidos en esta memoria de título, entregan información relevante respecto al estado sanitario de esta especie. Por una parte, se pudo establecer que los individuos de esta especie presentan infección tanto por el virus de la Inmunodeficiencia Viral Felina como por el virus de la Leucemia Viral Felina en su hábitat natural. Además, el análisis genético de los aislados virales sugiere que se trataría de una infección interespecie, en que la fuente de infección serían los gatos domésticos de la isla de Chiloé.

Para conocer el efecto que puede tener la introducción de estas enfermedades infecciosas en la población de esta especie, que eventualmente podría poner en riesgo su conservación, se sugiere realizar estudios futuros que aporten a este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a José Pizarro (PhD) por su invaluable apoyo, paciencia y valiosa entrega de conocimientos. A Constanza Napolitano (PhDc), por su inmensa confianza. A Rene Ortega (PhDc), por su apoyo y conocimientos en el trabajo de laboratorio. A Jennifer Hetz (PhDc), Valentina Sánchez (MV) y Juan Vidal por el desinteresado y valioso apoyo en el trabajo en terreno. A las comunidades locales de la Isla de Chiloé, por su ayuda y generoso apoyo. A mis amigos y familia por su constante apoyo, ánimo e incondicional compañía, especialmente a mi madre por su inmenso amor y esfuerzo de vida, gracias al cual mis logros han sido posibles. A Dennis por su amor y, porque hasta el día de hoy sigue siendo mi gran compañero en la vida.

Financiamiento: Laboratorio de Virología Animal FAVET Universidad de Chile, Laboratorio de Virología Animal FAVET Universidad de Concepción, Panthera Kaplan Awards Program.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARJONA A., BARQUERO N., DOMÉNECH A., TEJERIZO G., COLLADO V.M., TOURAL C., MARTÍN D., GOMEZ-LUCIA E. 2007. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of Feline Medicine and Surgery* 9: 14- 22.

BIEK R., RODRIGO A., HOLLEY D., DRUMMOND A., ANDERSON C., ROSS H., POSS M. 2003. Epidemiology, Genetic Diversity, and Evolution of Endemic Feline Immunodeficiency Virus in a Population of

Wild Cougars. *Journal of Virology* 77: 9578-9589.

BROWN M.C., MUNKHSOG B., TROYER J., ROSS S., SELLERS R., FINE A., SWANSON W., ROELKE M. E., O' BRIEN S. 2010. Feline Immunodeficiency virus (FIV) in wild Palla's cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134:90-95.

BROWN M.A., CUNNINGHAM M.W., ROCA A.L., TROYER J.L., JONSON W.E., O' BRIEN S.J. 2008. Genetic Characterization of Feline Leukemia Virus from Florida Panthers. *Emerging Infectious Disease* 14: 252-259.

CAMMAROTA G., DA PRATO L., NICOLETTI E., MATTEUCCI D., BENDINELLI M., PISTELLO M. 1996. Quantitation of feline immunodeficiency proviruses in doubly infected cats using competitive PCR and a fluorescence-based RFLP. *Journal of Virological Methods* 62: 21-31.

CARPENTER M., BROWN E., CULVER M., JOHNSON W., PECON - SLATTERY J., BROUSSET D., O' BRIEN S. 1996. Genetic and Phylogenetic Divergence of Feline Immunodeficiency Virus in the Puma (*Puma concolor*). *Journal of Virology* 70: 6682-6693.

CASEY J., ROACH A., MULLINS J., BURCK BAUMAN K., NICOLSON M., GARDNER M., DAVIDSON N. 1981. The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic

cats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78: 7778-7782.

CHANDLER E., GASKELL C., GASKELL R. 2004. Feline Leukemia Virus Infection in: Feline Medicine and Therapeutics. Editorial Blackwell Publishing, Oxford, UK. 597 pp.

—. 2004. Feline Immunodeficiency Virus Infection. in: Feline Medicine and Therapeutics. Editorial Blackwell Publishing, Oxford, UK. 607 pp.

CITES 2011. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestres. Documentos oficiales Apéndice I, II y III. En vigor a partir del 27 de abril de 2011 <http://www.cites.org/esp/app/S-110427.pdf>

CUNNINGHAM M.W., BROWN M.A., SHINDLE D.B., TERRELL S.P., HAYES K.A., FERREE B.C., MCBRIDE R.T., BLANKENSHIP E.L., JANSEN D., CITINO S.B., ROELKE M.E., KILTIE R.A., TROYER J.L., O'BRIEN S.J. 2008. Epizootiology and Management of Feline Leukemia Virus in the Florida Puma. Journal of Wildlife Diseases 44: 537–552.

FILONI C., ADANIA C., DURIGON E., CATAO-DIAS J. 2003. Serosurvey for Feline Leukemia Virus and Lentiviruses in captive small neotropic felids in Sao Paulo State, Brazil. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 34: 65-68.

FRANKLIN S., TROYER J., TERWEE J., LYREN L., BOYCE W., RILEY S., ROELKE M., CROOKS K., VANDEWOUDE S. 2007a. Frequent Transmission of Immunodeficiency viruses among Bobcats and Pumas. Journal of Virology 81: 10961-10969.

FRANKLIN S.P., TROYER J.L., TERWEE J.A., LYREN L.M., KAYS R.W., RILEY S.P., BOYCE W.M., CROOKS K.R., VANDEWOUDE S. 2007b. Variability in assays used for detection of lentiviral infection in bobcats (*Lynx rufus*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots (*Leopardus pardalis*). Journal of Wildlife Diseases 43: 700–710.

GARDNER I., HIETALA S., BOYCE W. 1996. Validity of using serological tests for diagnosis of diseases in wild animals. Revue Scientifique et Technique de l' Office International des Epizooties 15: 323-335.

GERET C., CATTORI V., MELI M., RIOND B., MARTÍNEZ F., LÓPEZ G., VARGAS., SIMÓN M., LÓPEZ –BAO J., HOFMANN-LEHMANN R., LUTZ H. 2011. Feline Leukemia virus outbreak in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*): high-throughput sequencing of envelope variable region A and experimental transmission. Archives of Virology 156: 839-854.

- GLADE, A.** 1993. Libro rojo de los vertebrados terrestres de Chile. Corporación Nacional Forestal, Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. 65 pp.
- GUIMARAES A., BRANDAO P., DE MORAES W., CUBAS Z., SANTOS L., VILLARREAL L., ROBES R., COELHO F., RESENDE M., SANTOS R., OLIVEIRA R., YAMAGUTI M., MARQUES L., NETO R., BUZINHANI M., MARQUES R., MESSICK J., BIONDO A., TIMENETSKY J.** 2009. Survey of Feline Leukemia and Feline Coronaviruses in captive neotropical wild felids from southern Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40: 360-364.
- HOFMANN-LEHMANN R., FEHR D., GROB M., ELGIZOLI M., PACKER C., MARTENSON J.S., O' BRIEN S.J., LUTZ H.** 1996. Prevalence of Antibodies to Feline Parvovirus, Calicivirus, Herpesvirus, Coronavirus, and Immunodeficiency Virus and of Feline Leukemia Virus Antigen and the Interrelationship of These Viral Infections in Free-Ranging Lions in East Africa. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3: 554–562.
- IRIARTE J.A.** 2008. Mamíferos de Chile. Editorial Lynx, Barcelona, España. pp. 230-231.
- IRIARTE J.A., FEINSINGER P., JAKSIC F.M.** 1997. Trends in wildlife use and trade in Chile. *Biological Conservation* 81: 9-20.
- IUCN.** 2011. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org. Downloaded on 08 Noviembre 2011.
- LEVY J., HARTMANN K., HOFMANN-LEHMANN R., LITTLE S., THAYER V.** 2008. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10: 300-316.
- MELI M., CATTORI V., MARTÍNEZ F., LÓPEZ G., VARGAS A., SIMÓN M., ZORRILLA I., MUÑOZ A., PALOMARES F., LÓPEZ-BAO J., PASTOR J., TANDON R., WILLI B., HOFMANN-LEHMANN R., LUTZ H.** 2009. Feline Leukemia Virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Plos One* 4: 1-9.
- MILLER S.D., ROTTMANN, J., RAEDEKE, K.J., TABER, R.D.** 1983. Endangered mammals of Chile: status and conservation. *Biological Conservation* 25: 335-352.
- MURPHY F.A., GIBBS E.P.J., HORZINEK M.C., STUDDERT M.J.** 1999a. Retroviridae. **In:** *Veterinary Virology*. Academic Press, San Diego, USA. 364 pp.
- . 1999b. Viral Genetics and Evolution. **In:** *Veterinary Virology*. Academic Press, San Diego, USA. pp. 61-66.

- NISHIMURA Y., GOTO Y., YONEDA K., ENDO Y., MIZUNO T., HAMACHI M., MARUYAMA H., KINOSHITA H., KOGA S., KOMORI M., FUSHUKU S., USHINOHAMA K., AKUZAWA M., WATARI T., HASEGAWA A., TSUJIMOTO H.** 1999. Interspecies Transmission of Feline Immunodeficiency Virus from the Domestic Cat to the Tsushima Cat (*Felis bengalensis euphilura*) in the Wild. *Journal of Virology* 9: 7916-7921.
- NOWELL K., JACKSON P.** 1996. Status Survey and Conservation Action Plan: Wild Cats. IUCN/SSC Cat Specialist Group. Gland, Switzerland. 382 pp.
- OLMSTED R., LANGLEY R., ROELKE M., GOEKEN R., JOHNSON D. GOFF J., ALBERT J., PACKER C., LAURENSEN K., CARO T., SCHEEPERS L., WILDT D., BUSH M., MARTENSON J., O' BRIEN S.** 1992. Worldwide Prevalence of Lentivirus Infection in Wild Feline Species: Epidemiologic and Phylogenetic Aspects. *Journal of Virology* 66: 6008-6018.
- PECON-SLATTERY J., TROYER J.L., JOHNSON W., O' BRIEN S.J.** 2008. Evolution of feline immunodeficiency virus in Felidae: Implications for human health and wildlife ecology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123: 32- 44.
- ROELKE M.E., BROWN M., TROYER J., WINTERBACH H., WINTERBACH C., HEMSON G., SMITH .D, JOHNSON R.C., PECON-SLATTERY J., ROCA A., ALEXANDER K., KLEIN L., MARTINELLI P., KRISHNASAMU K., O'BRIEN S.** 2009. Pathological manifestations of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in wild African lions. *Virology* 390: 1-12.
- SANDERSON J., SUNQUIST M., IRIARTE A.** 2002. Natural history and landscape-use of guigna (*Oncifelis guigna*) on Isla Grande de Chiloé. *Journal of Mammalogy* 83: 608-613.
- SIMONETTI J.** 2006. Conservación de biodiversidad en ambientes fragmentados: el caso del bosque maulino. *In*: Grez, A.A.; Simonetti J.A.; Bustamante , R.O. (Eds.). Biodiversidad de ambientes fragmentados de Chile: patrones y procesos a distintas escalas. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. pp. 213-229.
- SLEEMAN J., KEANE J., JOHNSON J., BROWN R., VAN WOUDE S.** 2001. Feline Leukemia Virus in a captive bobcat. *Journal of Wildlife Diseases* 37:194-200.
- TALBOTT R., SPARGERT E.E., LOVELACE K., FITCH W., PEDERSEN N., LUCIW P., ELDER.J.** 1989. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 5743-5747.
- TANDON R., CATTORI V., GOMES-KELLER M.A., MELI M.L., GOLDR M.C., LUTZ H., HOFFMAN-LEHMANN R.** 2005. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time

polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 130: 124-132.

THALWITZER S., WACHTER B., ROBERT N., WIBBELT G., MULLER T., LONZER J., MELI M., BAY G., HOFER H., LUTZ H. 2010. Seroprevalences to Viral Pathogens in Free-Ranging and Captive Cheetahs (*Acinonyx jubatus*) on Namibian Farmland. *Clinical and Vaccine Immunology* 17: 232-238.

TROYER J.L., PECON-SLATTERY J., ROELKE M.E., JOHNSON W., VANDEWOUDE S., VASQUEZ-SALAT N., BROWN M., FRANK L., WOODROFFE R., WINTERBACH C., WINTERBACH H., HEMSON G., BUSH M., ALEXANDER K.A., REVILLA E., O'BRIEN S.J. 2005. Seroprevalence and Genomic Divergence of Circulating Strains of Feline Immunodeficiency Virus among *Felidae* and *Hyaenidae* Species. *Journal of Virology* 79: 8282-8294.

TROYER J.L., VANDEWOUDE S., PECON-SLATTERY J., MCLINTOSH C., FRANKLIN S., ANTUNES A., JOHNSON W., O' BRIEN S.J. 2008. FIV cross-species transmission: an evolutionary prospective. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123: 159–166.

VANDEWOUDE S., TROYER J., POSS M. 2010. Restrictions to cross-species transmission of lentiviral infection gleaned from studies of FIV. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134: 25-32.

ZORONDO F. 2005. Conservación de carnívoros chilenos: el factor social. Memoria de Título Biología con Mención en Medio Ambiente. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 41 pp.